Islamic Azad University
Gorgan Branch

Journal of
Plant Environmental Physiology

Print ISSN: 2423-7671
Online ISSN: 2783-4689

PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran

The effect of solvent type and concentration on extraction of phenolic compounds and evaluation of antioxidant activity of *Crataegus elbursensis* L. leaf collected from Golestan province

Mohammad Moghaddam[1*], Leila Mehdizadeh[2]

[1]Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, Email: m.moghadam@um.ac.ir

[2]Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, Email: l.mehdizadeh@gmail.com

Article type:
Research article

Article history
Received: 05.01.2020
Revised: 15.05.2020
Accepted: 19.05.2020
Published:22.02.2023

Keywords
Antioxidant capacity
Crataegus elbursensis
Extract
Phenolic compounds
Solvent

Abstract

In order to investigate the effect of the type and concentration of solvent on the amount of extraction of phenolic compounds and antioxidant activity of *Crataegus elbursensis* leaves, a research was performed in two separate experiments. At first experiment the effect of solvent type (acetone, ethanol, methanol) at three concentrations (50, 80 and 100%) on extracted total phenolic content of *C. elbursensis* leaf was evaluated. At second experiment antioxidant capacity of produced extract from the best solvent at first experiment with the highest phenolic compounds (methanol 80%) was investigated by two different methods including total antioxidant and Fe reduction capacity. The results of these experiments showed that all three solvents; acetone, ethanol and methanol; in the form of mixture with water have more potential for extracting phenolic compounds toward the pure ones. The highest total phenolic content (118 mg GAE/g DW) was obtained at 80% concentration of all solvents, especially at methanol 80%. The results of evaluating antioxidant activity showed that with increasing the concentration of extract up to 500 µg/mL, antioxidant activity (0.8 mg/mL) was increased. Investigation of Fe reduction capacity indicated that with increasing the concentration of extract up to 800 µg/mL, the amount of absorption of the solvents contain the extract significantly increased. Therefore, according to the results of this study, the leaves of this plant can be used as the source of phenolic and antioxidants in different industries.

Cite this article as: Moghaddam, M., Mehdizadeh, L. (2022). The effect of solvent type and concentration on extraction of phenolic compounds and evaluation of antioxidant activity of *Crataegus elbursensis* L. leaf collected from Golestan province. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 68(4): 95-108.

©The author(s)
Doi: 10.30495/iper.2022.688803
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.68.5.4

فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۷۶۷۱
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان

تأثیر نوع و غلظت حلال بر میزان استخراج ترکیبات فنلی و سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ سیاه ولیک (*Crataegus elbursensis* L.) جمع‌آوری شده از استان گلستان

محمد مقدم[1*]، لیلا مهدی‌زاده[2]

۱ دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، رایانامه: m.moghadam@um.ac.ir

۲ دانشجوی دکتری علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، رایانامه: l.mehdizadeh@gmail.com

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۵
تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۰۲/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۳۰
تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۱۲/۰۳

واژه‌های کلیدی:
ترکیبات فنلی
حلال
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی
عصاره
ولیک

چکیده

به منظور بررسی اثر نوع و غلظت حلال بر میزان استخراج ترکیبات فنلی و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌های گیاه سیاه ولیک (*Crataegus elbursensis* L.)، پژوهشی به‌صورت دو آزمایش مجزا انجام شد. در آزمایش اول اثر نوع حلال (استون، اتانول و متانول) در سه غلظت (۵۰، ۸۰ و ۱۰۰٪) بر محتوای ترکیبات فنلی کل استخراج شده از برگ سباه ولیک بررسی شد. در آزمایش دوم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بدست آمده از بهترین حلالی که بالاترین میزان استخراج ترکیبات فنلی را داشت (متانول ۸۰٪) به دو روش ارزیابی آنتی‌اکسیدانی کل و ظرفیت احیای آهن بررسی شد. نتایج حاصل از این آزمایشات نشان داد هر سه حلال استون، اتانول و متانول در حالت مخلوط با آب نسبت به حالت خالص توانایی بیشتری جهت استخراج ترکیبات فنلی دارند. بیشترین میزان ترکیبات فنلی کل (۱۱۸ mg GAE/ g DW) در غلظت ۸۰ درصد کلیه حلال‌ها، به ویژه در متانول ۸۰ درصد حاصل شد. نتایج بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد با افزایش غلظت عصاره تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) افزایش یافت. بررسی ظرفیت احیاکنندگی آهن حاکی از آن است که با افزایش غلظت عصاره تا ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، میزان جذب محلول‌های حاوی عصاره به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، برگ‌های این گیاه می‌توانند به عنوان منبع فنل و آنتی‌اکسیدان در صنایع مختلف استفاده شوند.

استناد: مقدم، محمد؛ مهدی‌زاده، لیلا. (۱۴۰۱). تأثیر نوع و غلظت حلال بر میزان استخراج ترکیبات فنلی و سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ سیاه ولیک (*Crataegus elbursensis* L.) جمع‌آوری شده از استان گلستان. *فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ۶۸ (۴)، ۱۰۸-۹۵.

Doi: 10.30495/iper.2022.688803
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.68.5.4

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

امروزه، استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌های مزمن از جمله تصلب شرایین و سرطان توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف کرده است. در این میان، مهم‌ترین ترکیبات طبیعی سلامت‌بخش، آنهایی هستند که در درمان بیماری‌های قلبی-عروقی و مشکلات مرتبط با قلب و عروق، کاربرد دارند. ولیک نام متداول تمام گونه‌های گیاهی متعلق به جنس *Crataegus* است که عضوی از خانواده گل‌سرخیان (Rosaceae) می‌باشد. غالب گونه‌های آن در نواحی معتدل نیمکره شمالی پراکنده‌اند که حدود ۲۸۰ گونه در شرق آسیا، اروپا و آمریکای شمالی یافت می‌شود. ۱۳ گونه از این جنس به طور پراکنده در جنگل‌های شمال ایران به فراوانی می‌رویند. درختان ولیک در نواحی حاشیه‌های جنگلی مناطق پست‌تر و گرمتر می‌رویند. میوه اکثر گونه‌های ولیک در اوایل تا اواسط پاییز می‌رسد (Ghahreman, 2007). سیاه ولیک (*Crataegus elbursensis* L.)، فراوان‌ترین گونه ولیک بومی ایران بوده که به فراوانی در جنگل‌های نواحی شمال کشور یافت می‌شود. این گیاه در واقع، درختچه یا درختان کوچک به ارتفاع ۷-٤ متر با برگ‌هایی کوچک و خزان‌کننده به طول ۳۰-۲۰ میلی‌متر و دارای ۳ و گاهی ۵ لبه که لبه‌ها در انتها دارای دندانه‌های اره‌ای‌اند، با گل‌هایی سفید و مجتمع و متشکل از ٥-٤ عدد خامه و میوه‌هایی به رنگ سیاه یا آبی سیاه، بیضی یا کروی، به طول تقریبی ۱۰-۸ میلی‌متر با ٥-٤ عدد هسته دارای سطح پشتی کمی شیاردار و سطح شکمی محدب، می‌باشند (Ghahreman, 2007). ولیک جهت درمان بیماری‌های دستگاه گوارش و مشکلات قلبی، به‌عنوان غذا و در طب سنتی، در آمریکا، اروپا و چین مورد استفاده قرار گرفته است (Zargari, 1997).

ترکیبات فنلی گیاهی به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در نظر گرفته می‌شوند. اثرات سلامت بخش برخی فنل‌های گیاهی، برای تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان بسیار حائز اهمیت است. ترکیبات فنلی مطرح به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های فنلی از لحاظ منشاء به دو گروه طبیعی و سنتزی طبقه‌بندی می‌شوند که در نتیجه ساختار شیمیایی ویژه خود، از پتانسیل‌های ضد اکسایشی مختلف نظیر مهارسازی رادیکال‌های آزاد، غیرفعال‌سازی اکسیژن یگانه و تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی می‌باشند. امروزه با توجه به اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر بدن، یافتن منابع آنتی‌اکسیدانی با منشاء طبیعی و جایگزینی آن با انواع سنتزی، به‌میزان زیادی مورد توجه محافل علمی قرار گرفته است (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). قابلیت استخراج ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات در عصاره‌ی خام به فاکتورهای زیادی از جمله قطبیت و pH حلال‌ها، زمان و دمای استخراج و نیز نوع و ساختار شیمیایی ترکیبات فنلی، بستگی دارد. بنابراین بهینه‌سازی سیستم استخراج با هدف کسب بالاترین میزان ترکیبات فنلی بسیار حائز اهمیت است. زمان و دمای استخراج ترکیبات فنلی از پارامترهای مهم دیگری است که حتی از جنبه به حداقل رساندن قیمت انرژی فرآیند، می‌بایست بهینه‌سازی شوند. حلال‌های الکلی عموما جهت استخراج فنل‌ها از منابع طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. جهت استخراج ترکیبات فنلی از محصول تازه عموما حلال‌هایی مانند متانول، اتانول، استون، پروپانول، اتیل‌استات و دی‌متیل‌فرم‌آلدهید استفاده شده است (Pham et al., 2015).

در مطالعه قبلی میزان ترکیبات فنلی کل در عصاره آبی میوه گونه‌ای ولیک (*C. monogyna*) (٦١ میلی گرم بر ۱۰۰ گرم عصاره خشک) گزارش شده است

(Bernatonienė et al., 2008). همچنین، عصاره‌های حاصل از گل‌های خشک و سرشاخه‌های گلدار (گل‌ها با برگ‌های جوان) ولیک (*C. monogyna*) حاوی مقادیر بالاتری از ترکیبات فنلی (۵۰ گرم بر کیلوگرم عصاره خشک) نسبت به میوه‌های تازه آن (۱۰ گرم بر کیلوگرم عصاره خشک) بودند و عصاره‌های حاصل از گل‌ها و سرشاخه‌های گلدار فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی/مهارکنندگی رادیکال بالاتری نسبت به عصاره‌های خشک و تازه میوه‌ها نشان دادند (Froehlicher et al., 2009). علاوه‌براین، میزان ترکیبات فنلی کل در عصاره‌های اولتراسوند میوه گونه‌ای دیگر ولیک (*C. pentagyna*) ۹۰/۸۳ میلی‌گرم بر حسب اسید گالیک بر میلی‌لیتر گزارش شد (Rabiei et al., 2012). با این وجود، تاکنون گزارشی مبنی بر استخراج ترکیبات زیست فعال موجود در برگ ولیک بومی ایران (*C. elbursensis*) در منابع علمی وجود ندارد. لذا در این تحقیق از حلال‌های مختلف در غلظت‌های متفاوت جهت استخراج فنل تام کل گیاه استفاده شد. سپس بهترین حلال که بیشترین ترکیبات فنلی را استخراج نمود به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه و عصاره گیاهی: در این تحقیق برگ‌های گیاه ولیک بلافاصله بعد از جمع‌آوری از جنگل شصت کلاته (واقع در شهرستان گرگان، استان گلستان با عرض جغرافیایی ´۴۵ ´۳۶ ^{0} شمالی و طول جغرافیایی ´۲۳ ´۵۴ ^{0} شرقی) در فصل بهار در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند و تا زمان آزمایش در کیسه‌های محافظ به هوا و رطوبت در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا ترکیبات فنلی موجود در آن‌ها دچار آسیب نگردند. در زمان آزمایش، نمونه‌های خشک شده توسط آسیاب به ذرات بسیار ریز تبدیل و از الک با مش ۴۰ گذرانده شدند. عصاره‌های فنلی با روش خیساندن در حلال‌های متانول، اتانول و استون تهیه گردید. حلال‌های استون، اتانول و متانول به صورت خالص و نیز مخلوط با آب در سه سطح غلظتی (۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد) جهت استخراج ترکیبات فنلی کل موجود در برگ‌های ولیک مورد استفاده قرار گرفتند تا مناسب‌ترین حلال و غلظت با بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنلی کل تعیین گردد. بدین صورت که ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال با ۱۰ گرم از پودر خشک برگ‌ها (نسبت ۱ به ۲۰ وزنی-حجمی) به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط در انکوباتور شیکردار مخلوط شد. بعد از این مرحله، عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک فیلتر شدند. عصاره‌ها به وسیله تبخیرکننده چرخان تحت خلاء در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و سپس توسط خشک کن انجمادی، خشک و به پودرهای خشک فریزدرایر شده، تبدیل شدند. پودرهای خشک فریزدرایر شده‌ی حاصل برای آزمایشات بعدی و تا زمان استفاده در ظروف غیرقابل نفوذ به هوا در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007).

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل: میزان کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ی استخراجی از برگ‌های ولیک با روش فولین سیکالتو و بر مبنای استاندارد اسید گالیک ($Y=۰/۰۶۶۹x + ۰/۰۱۱۶$ ،$R^{۲}=۰/۹۹۸۷$) اندازه‌گیری شد (Slinkard and Singleton, 1977). بطور خلاصه ۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره‌ی استخراجی با ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیکالتو در لوله آزمایش مخلوط شد. بعد از گذشت ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰٪) به آن‌ها افزوده

شد. لوله‌های آزمایش بعد از تکان دادن درون حمام آب با دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٧٦٠ نانومتر خوانده شد. میزان ترکیبات فنلی کل موجود در عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده و معادله خط حاصل برای اسید گالیک محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم وزن خشک بیان شد.

با توجه به نتایج حاصل از ارزیابی میزان ترکیبات فنلی کل استخراج شده با حلال‌های متفاوت در غلظت‌های مختلف، حلال متانول ۸۰ درصد به‌عنوان بهترین حلال برای استخراج بیشترین ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش‌های ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و ظرفیت احیای آهن انتخاب شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل[1]: در این روش محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف از پودرهای فنلی فریزدارید شده و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT به ترتیب در حلال استخراجی و متانول آماده شدند. در این آزمون ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره‌ی فنلی و آنتی‌اکسیدان سنتزی با ۱ میلی‌لیتر از معرف (اسید سولفوریک ٠/٦ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ٤ میلی‌مولار) در لوله‌ی آزمایش مخلوط شدند و به مدت ۱/۵ ساعت در حمام آب با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از سرد کردن، جذب نمونه‌ها در طول موج ٦٩٥ نانومتر خوانده شد. در نمونه کنترل به جای عصاره از ۰/۱ میلی‌لیتر حلال مصرفی استفاده شد (Prieto et al., 1999).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش ظرفیت احیاءکنندگی آهن: توانایی عصاره به‌منظور احیاء آهن سه ظرفیتی تعیین شد (Yildirim et al., 2001). در این روش، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف از عصاره‌های فنلی فریزدرایر شده و نیز آنتی‌اکسیدان - سنتزی BHT به ترتیب در حلال استخراجی و متانول تهیه گردید. یک میلی‌لیتر از محلول عصاره یا آنتی‌اکسیدان سنتزی با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (٦/٦ =pH و ۰/۲ =M) و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید (۱۰ گرم در لیتر) مخلوط شد و به‌مدت نیم ساعت در حمام آب با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ (وزنی- حجمی) به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g ١٦٥٠ سانتریفوژ شد. ۲/۵ میلی‌لیتر محلول (فاز رویی بعد از سانتریفوژ) با ۲/۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن (III) (۱ گرم در لیتر) مخلوط و جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد که میزان جذب بالا نشان دهنده‌ی قدرت احیاءکنندگی بالای عصاره‌ها می‌باشد.

در این مطالعه، تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده مربوط به اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی کل و نیز ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی کل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آنالیز قرارگرفت. تیمارها در سه تکرار انجام شد و نتایج با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($p<$ ۰/۰۵) و با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمودارها با نرم افزار Excel شدند و از خطای استاندارد (SE) برای نشان دادن Error bar استفاده شد.

نتایج

مقدار ترکیبات فنلی کل: نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که اثر نوع حلال و غلظت آن بر استخراج ترکیبات فنلی کل معنی‌دار است (۰/۰۵ >p) (جدول ۱).

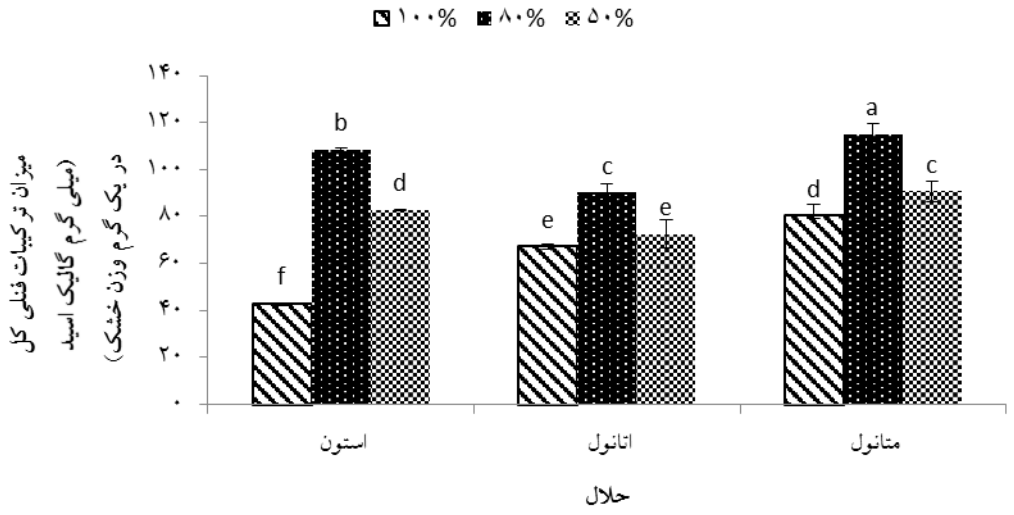
1. Total antioxidant capacity

جدول ۱: آنالیز واریانس (میانگین مربعات) اثر نوع حلال و غلظتهای مختلف آن بر محتوای ترکیبات فنلی کل برگ ولیک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میزان **ترکیبات فنلی کل**
نوع حلال	۳	۸۳۰/۴۱ **
غلظت	۲	۳۷۹۳/۱۱**
خطا	۲۴	۸۱/۲۴

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

نتایج مقایسه میانگین مقدار کل ترکیبات فنلی کل موجود در عصاره‌های مختلف استخراجی از برگ ولیک حاکی از آن است که هر سه حلال استون، اتانول و متانول در حالت مخلوط با آب به‌طور معنی‌داری توانایی بیشتری جهت استخراج ترکیبات فنلی کل از بافت برگ‌های ولیک را نسبت به حالت خالص دارند ($p< ۰/۰۵$) (شکل ۲). اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های خالص (۱۰۰٪)، ۵۰ و ۸۰ درصد کلیه حلال‌ها مشاهده گردید. در این بین بیشترین میزان استخراج ترکیبات فنلی کل در کلیه حلال‌ها با استفاده از غلظت ۸۰ درصد آنها حاصل شد و غلظت ۵۰ درصد و حلال خالص به‌ترتیب در مراتب بعدی قرار داشتند. در میان حلال‌های مورد استفاده بیشترین میزان ترکیبات فنلی کل در متانول ۸۰ درصد حاصل شد (شکل ۱).



شکل ۱: اثر نوع حلال و غلظت‌های آن بر محتوای ترکیبات فنلی کل استخراجی از برگ ولیک (حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ است).

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر نوع حلال مورد استفاده جهت استخراج ترکیبات فنلی کل معنی‌دار شد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۲). عملکرد حلال‌ها در استخراج ترکیبات فنلی کل به ترتیب کاهشی: متانول ۸۰٪> استون ۸۰٪> اتانول ۸۰٪ بود.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: با توجه به اینکه بین میزان ترکیبات فنلی کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارتباط وجود دارد و بیشترین میزان ترکیبات فنلی کل در عصاره متانولی ۸۰٪ مشاهده شد، از این رو، در این پژوهش عصاره حاصل از متانول ۸۰٪ به منظور

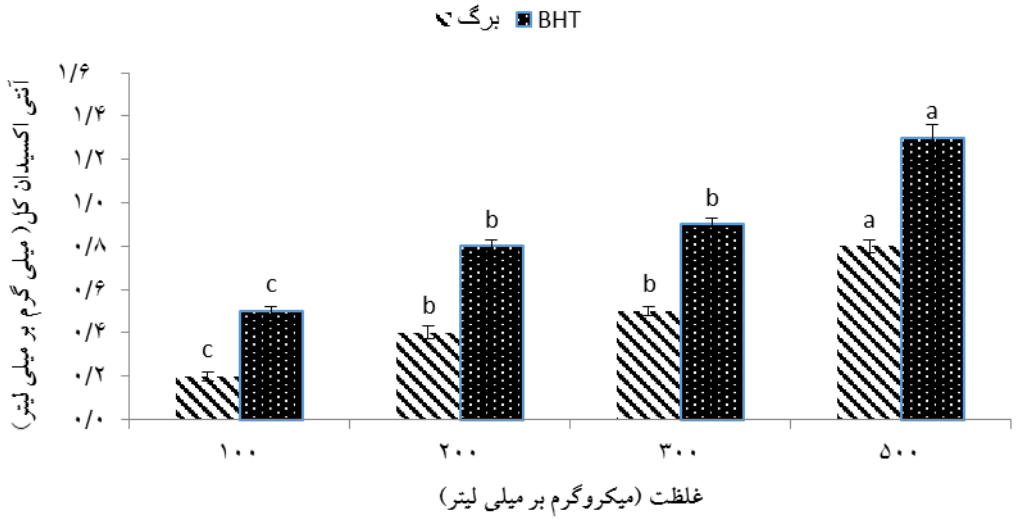
ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ ولیک انتخاب شد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در غلظت‌های مختلف عصاره متانولی برگ ولیک با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT وجود دارد ($p< ۰/۰۵$) (جدول ۲).

جدول ۲: آنالیز واریانس (میانگین مربعات) اثر غلظت عصاره متانولی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل برگ ولیک و BHT

منابع تغییرات	درجه آزادی	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل برگ ولیک	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل BHT
غلظت عصاره	۳	۰/۱۸۷۵۰۰**	۰/۳۲۷۵۰۰ **
خطا	۱۱	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۴۳۷۵

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱درصد

نتایج آنالیز واریانس اثر غلظت عصاره متانولی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل آنتی‌اکسیدان سنتزی (BHT) و عصاره‌های برگ ولیک در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها حاکی از آن است که با افزایش غلظت عصاره تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافت (شکل ۲). در تمام غلظت‌های مورد بررسی، تمام نمونه‌ها فعالیت بالایی را نشان دادند اما فعالیت آنتی‌اکسیدان سنتزی بیشتر از عصاره‌های برگ ولیک بود.



شکل ۲ : مقایسه میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل غلظت‌های مختلف عصاره‌های برگ ولیک و آنتی‌اکسیدان سنتزی (حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ است).

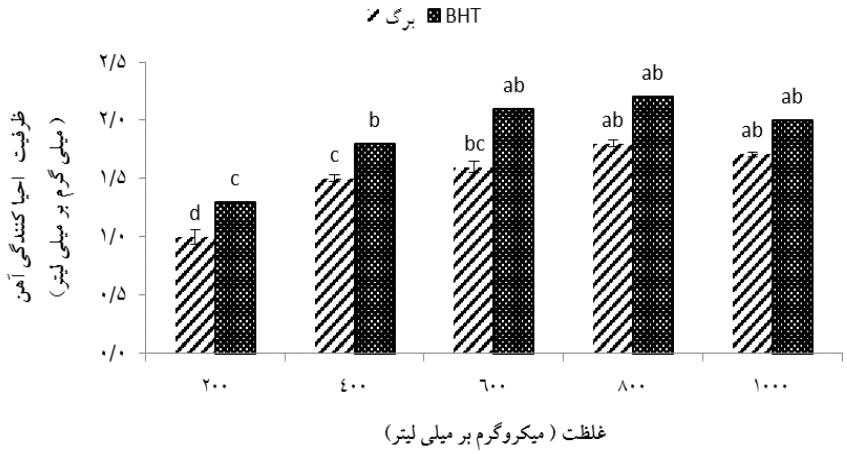
ظرفیت احیاءکنندگی آهن: نتایج آنالیز واریانس اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های برگ ولیک و آنتی‌اکسیدان سنتزی حاکی از آن است که عصاره‌ها از نظر ظرفیت احیاءکنندگی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر و با آنتی‌اکسیدان سنتزی دارند ($p < ۰/۰۵$) (جدول ۳).

جدول ۳: آنالیز واریانس (میانگین مربعات) اثر غلظت عصاره متانولی بر ظرفیت احیاءکنندگی برگ ولیک و BHT

منابع تغییرات	درجه آزادی	ظرفیت احیاکنندگی برگ ولیک	ظرفیت احیاکنندگی BHT
غلظت عصاره	٤	۰/۲۹۲۸۲۷ **	۰/۰۰۳۸۲۷ **
خطا	۱۰	۰/۳۸۱۰۰ **	۰/۳۲۷۵۰۰ **

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

نتایج مقایسه میانگین میزان جذب غلظت‌های مختلف عصاره برگ ولیک و نیز آنتی‌اکسیدان سنتزی مشخص کننده آن است که با افزایش غلظت، ظرفیت احیاءکنندگی آنتی‌اکسیدان سنتزی بیشتر از عصاره برگ است. با افزایش غلظت عصاره تا ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، میزان جذب محلول‌های حاوی عصاره به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (شکل ۳). بنابراین ظرفیت احیاءکنندگی عصاره‌ها وابسته به غلظت است. در محدوده غلظت ۱۰۰۰-۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر میزان فعالیت احیاءکنندگی آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT و عصاره برگ تعیین گردید (شکل ٤).



شکل ۳: مقایسه میانگین ظرفیت احیاءکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌های برگ ولیک و آنتی‌اکسیدان سنتزی (حروف غیرمشابه در هر غلظت بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ است).

بحث

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به طور معمول با استفاده از تکنیک‌های استخراج جامد-مایع کلاسیک از بافت‌های گیاهی استخراج می‌شوند. حلال‌های استخراجی معمولا مخلوط آب و الکل هستند که نسبت اختلاط، به ترکیبات هدف بستگی دارد (Singh and Singh, 2008). بازده استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از مواد گیاهی به طور عمده تحت تأثیر شرایط استخراج نظیر نوع حلال مورد استفاده، درجه پلیمریزاسیون فنل‌ها و برهم‌کنش‌شان با سایر اجزا، قرار می‌گیرد. تفاوت فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها می‌تواند به دلیل قطبیت‌های مختلف حلال‌ها باشد و بنابراین موجب قابلیت استخراج آنتی‌اکسیدانی‌های مختلف می‌شود. خواص آنتی‌اکسیدانی ترکیبات منفرد در یک گروه می‌تواند به طرز چشمگیری متفاوت باشد، به‌طوری‌که میزان یکسانی از فنل‌ها لزوما دارای پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی مشابه نیستند. تنوع گسترده‌ای در اثربخشی ترکیبات

مختلف فنلی به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. فعالیت‌های مختلف آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های فنلی غنی از ترکیبات فنلی را می‌توان به حلال استخراج کننده مختلف نسبت داد زیرا فعالیت آنتی‌اکسیدانی به نوع و قطبیت حلال استخراجی، روش‌های جداسازی، خلوص ترکیبات فعال و همچنین سیستم آزمایشی بستگی دارد (Pham et al., 2015). محققان زیادی ترکیبات فعال زیستی موجود در بافت‌های گیاهی و فعالیت عصاره‌های مختلف استخراجی از برخی گیاهان را در شرایط آزمایشگاهی و بیولوژیکی بررسی نموده‌اند؛ اما تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر شناسایی، اندازه‌گیری و ارزیابی ترکیبات فعال زیستی موجود در برگ ولیک بومی ایران (*C. elbursensis*) در منابع علمی مشاهده نشده است. متانول معمولاً برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی پیشنهاد شده است و اثربخشی آن در استخراج ترکیبات فعال زیستی بویژه در استخراج مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هنگامی که با آب به‌عنوان حلال کمکی مخلوط می‌شود، افزایش می‌یابد (Huda-Faujan et al., 2009). محققان دیگر نیز به‌منظور استخراج ترکیبات فنلی با استفاده از حلال‌های استون، اتانول و متانول به صورت خالص و مخلوط با آب گزارش نموده‌اند که مقدار ترکیبات فنلی عصاره‌ها در حالت خالص حلال کمتر از حالت مخلوط آن است و با افزودن ۵۰٪ آب به حلال‌های الکلی، کارائی حلال‌ها در استخراج ترکیبات فنلی به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (Turkmen et al., 2006). در تحقیقی دیگر نیز کاراترین حلال‌ها در استخراج ترکیبات فنلی، حلال‌های اتانول و متانول به‌صورت مخلوط با آب بود (Yu et al., 2005). همچنین در مطالعه‌ای دیگر برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از ۹ حلال مختلف با قطبیت متفاوت استفاده کردند و تفاوت‌های مشاهده شده بین عصاره‌های مختلف را با تفاوت در قطبیت حلال مورد استفاده مرتبط دانستند و گزارش نمودند که حلال‌ها با درجه قطبیت پایین نظیر هگزان، استون، بوتانول و کلروفرم نسبت به حلال‌های قطبی از توانایی کمتری در استخراج این ترکیبات برخوردار هستند (Mohsen and Ammar, 2009). علاوه‌براین نتایج حاصل از استفاده حلال‌های اتانول، متانول، استون به‌صورت خالص و همراه با آب حاکی از آن بود که اتانول و استون به شکل خالص کارائی چندانی برای استخراج ترکیبات فنلی نداشتند؛ اما در حالتی که با آب مخلوط شوند (۲۰٪)، میزان ترکیبات فنلی عصاره ۱۶-۱۴ برابر افزایش یافت (Jung et al., 2006). در ارزیابی عصاره‌های متانولی، استونی و آبی برگ شاه توت، عصاره متانولی از بالاترین درصد بازده استخراج، بیشترین مقدار ترکیبات فنلی کل و بالاترین میزان فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی برخوردار بود (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007). نتایج این محققان در توافق با نتایج حاصل از این پژوهش می‌باشد. در این پژوهش نیز از روش استخراج کلاسیک (غرقابی) و حلال متانول ۸۰٪ به‌منظور بررسی و مقایسه محتوای فنل و نیز ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه ولیک استفاده شد. لذا طبق نتایج به نظر می‌رسد که عصاره برگ ولیک از محتوای ترکیبات فعال زیستی قابل توجهی برخوردار هستند.

بر مبنای تحقیقات انجام شده، میزان ترکیبات فنلی موجود در بافت‌های گیاهی و نیز در گونه‌های مختلف گیاهان تابع تغییرات فصلی، مکان جغرافیایی، شرایط خاک، فاکتورهای ژنتیکی، فاز رویشی، بخش مورد استفاده گیاه، عملیات پس از برداشت و شرایط نگهداری می‌باشد (Rumbaoa et al., 2009; Faller et al., 2009). همچنین محتوای فنلی تحت تاثیر پیش تیمارهای نمونه (مثل روغن‌گیری و کاهش اندازه

ذرات) و شرایط مورد استفاده جهت تهیه عصاره (نسبت حلال به نمونه، نوع حلال، زمان و دمای استخراج) قرار می‌گیرد (Spigno et al., 2007).

حلال‌های الکلی عموما جهت استخراج فنل‌ها از منابع طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ بویژه مخلوط‌های الکل-آب، گرچه این حلال‌ها به صورت گزینشی عمل نمی‌کنند. استفاده از آب به عنوان حلال استخراج، یک محیط کاملاً قطبی ایجاد می‌کند که در آن برخی از ترکیبات فنلی با درجه قطبیت پائین به میزان کمتری استخراج می‌شوند. افزودن آب به حلال‌های آلی با تشکیل یک محیط نسبتاً قطبی همراه بوده و بنابراین از استخراج مقادیر و انواع بیشتری از ترکیبات فنلی در این شرایط اطمینان حاصل می‌گردد. علاوه‌براین، عصاره‌ی آبی حاوی مقادیر زیادی از ناخالصی‌ها نظیر اسیدهای آلی، پروتئین‌ها و قندهای محلول می‌باشد که می‌توانند در تشخیص و تعیین مقدار ترکیبات فنولی تداخل ایجاد نمایند. اتانول، متانول و استون از رایج‌ترین حلال‌های الکلی مورد استفاده جهت استخراج ترکیبات پلی‌فنل گیاهی می‌باشند (Hayouni et al., 2007). درجه قطبیت حلال‌های مختلف میزان استخراج ترکیبات پلی‌فنلی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. عصاره‌های حاصل از حلال‌های مختلف از نظر مقدار ترکیبات فنل کل، نوع ترکیبات استخراج شده و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوت هستند. حلالیت ترکیبات فنلی بسته به نوع حلال، درجه پلیمریزاسیون آنها و برهمکنش آنها با سایر ترکیبات موجود در بافت‌های گیاهی متفاوت است. به‌عنوان مثال حلال‌های غیرقطبی نظیر استون معمولاً برای استخراج ترکیبات فنلی لیپوفیل مناسب به نظر می‌رسند (Trabelsi et al., 2010). در کل حلال-های اتانول و متانول به صورت مخلوط با آب (۸۰-۴۰ درصد) توانائی بیشتری نسبت به حالت خالص در استخراج ترکیبات فنلی از بافت‌های گیاهی دارند (Suzuki et al., 2002).

محتوای ترکیبات فنلی کل پارامتر مهمی از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل است و به‌طور گسترده جهت ارزیابی عصاره‌های آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. انواع مختلفی از ترکیبات فنلی وجود دارند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی‌شان بستگی به ساختار آن‌ها دارد. در نتیجه، میزان کل ترکیبات فنلی به تنهایی معیار دقیق و ثابتی جهت اثبات قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای یک نمونه نیست؛ بلکه ماهیت، نوع و میزان ترکیبات فنلی یک ماده گیاهی، شاخص قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای آن است (Soares et al., 2009). تعیین محتوای ترکیبات فنلی کل می‌تواند به عنوان سنجشی غیرمستقیم از پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی درنظر گرفته می‌شود (Mohsen and Ammar, 2009).

میزان ترکیبات فنلی موجود در بافت‌های گیاهی و نیز در گونه‌های مختلف گیاهان تابع فاکتورهای ژنتیکی، فاز رویشی و بخش مورد استفاده گیاه می‌باشد (Faller et al., 2009). در مطالعه قبلی گزارش شد که عصاره اتانولی ۴۵٪ برگ و گل گونه‌ای ولیک (*C. monogyna*) محتوای ترکیبات فنلی کل بیشتری با مقدار ۱/۴ میلی‌گرم بر حسب اسید گالیک بر میلی‌لیتر عصاره نسبت به عصاره میوه با میزان ۰/۸ میلی‌گرم بر حسب اسید گالیک بر میلی‌لیتر بود (Shortle et al., 2014). همچنین در مطالعه‌ای روی زعفران، میزان ترکیبات فنولی کل (۶/۴۳ mg GAE/ g DW) در کلاله گزارش شد (Tajik et al., 2018). با توجه به‌میزان ترکیبات فنلی کل در این تحقیق در عصاره برگ *C. elbursensis* به ویژه در عصاره متانول ۸۰٪ (۱۱۸ mg GAE/ g DW) و در مقایسه با عصاره حاصل از سایر گونه‌های ولیک

که در مطالعات قبلی گزارش شده است، گونه بومی ایران به‌عنوان یکی از منابع با ارزش حاوی ترکیبات فنلی کل دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.

از آنجایی که ماهیت شیمیائی عصاره‌های گیاهی بسیار پیچیده بوده و از ترکیبات مختلف با قطبیت و عملکردهای متفاوت تشکیل شده است، ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی تنها با یک روش نتایج پراکنده‌ای را ارائه می‌دهد. بنابراین استفاده از چند روش مختلف به صورت همزمان می‌تواند اطلاعات بیشتری و دقیق‌تری را در زمینه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی فراهم نماید. برخی از عصاره‌ها حاوی ترکیبات هیدروفیلیک و/یا هیدروفوبیک می‌باشند و بنابراین ممکن است در برخی از روش‌های مورد بررسی ضعیف‌تر عمل کنند. علاوه‌براین به دلیل مکانیسم‌های متفاوتی که در هر روش دخالت دارند، روند به‌دست آمده در هر آزمون قابل مقایسه با روش‌های دیگر نخواهد بود. روش‌های مختلفی جهت ارزیابی فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مطرح است که براساس شرایط و مکانیسم‌های واکنش، نوع سوبسترای اکسیدشونده، اکسیدان‌ها، فناوری تشخیص و بیان نتایج، متفاوت است. مکانیسم‌های مختلف انواع روش‌های ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مبتنی بر انتقال اتم هیدروژن، انتقال الکترون، قدرت احیاءکنندگی و شلاته‌کنندگی فلزات است (Shahidi and Zhong, 2015). بنابراین، بهتر است به‌منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مجموعه‌ای از روش‌های شیمیایی و بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گیرد. ترکیبات فنلی مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی بخش آبدوست می‌باشند (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007). نتایج این پژوهش با نتایج پژوهشی دیگر همخوانی داشت که بیانگر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نتیجه افزایش غلظت عصاره بود (Salmanian et al., 2014).

ظرفیت احیاءکنندگی یکی از مکانیسم‌های عمل آنتی‌اکسیدان‌ها به شمار می‌رود. در این روش توانائی عصاره‌ها یا آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT برای احیاء آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی سنجیده می‌شود. در این روش، احیاء آهن سه ظرفیتی معیاری برای قابلیت الکترون‌دهی ترکیبات فنلی است. این مسئله مکانیسم مهمی را در فرایند اکسایش ترکیبات فنلی تشکیل می‌دهد. ظرفیت دهندگی الکترون (نیروی احیاءکنندگی) مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیستی می‌باشد (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007). اختلاف مشاهده شده بین ظرفیت احیاءکنندگی برگ ولیک را می‌توان به تفاوت در میزان و نوع ترکیبات فعال زیستی استخراج شده نسبت داد؛ زیرا میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی مختلف با توجه به ساختار شیمیائی آنها متفاوت است. علاوه‌براین در طی فرآیند استخراج ترکیبات دیگری که حلالیت بالایی در آب و محلول‌های الکلی دارند، همراه با ترکیبات فنلی وارد عصاره می‌شوند. از آنجائی‌که برخی از این ترکیبات نظیر اسید اسکوربیک، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و قندها خود اهداءکننده‌ی الکترون می‌باشند، بنابراین درصد بیشتری از یون‌های آهن سه ظرفیتی با جذب الکترون، احیاء شده و در نتیجه شدت جذب محلول افزایش می‌یابد. در کل ویژگی‌های احیاءکنندگی با حضور ترکیبات اهداءکننده‌ی الکترون همراه است. به‌عبارتی با افزایش میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره، نیروی احیاءکنندگی آن نیز افزایش می‌یابد. در نتیجه عصاره قادر خواهد بود با اهداء الکترون یا اتم‌های هیدروژن واکنش‌های زنجیری تشکیل رادیکال‌های آزاد را شکسته و اکسایش را به تاخیر بیاندازد. واکنش ترکیبات احیاءکننده با پیش‌سازهای پراکسید نیز یکی دیگر از مکانیسم‌هایی است که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و احیاءکننده از تشکیل

پراکسید در روغن‌ها و چربی‌ها جلوگیری می‌کنند (Kumaran and Karunakaran, 2007). در ارزیابی نیروی احیاءکنندگی عصاره‌های گیاهی مختلف مشخص شده است، عصاره‌هایی که حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات فنلی بودند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نیز داشتند. در نتیجه، ظرفیت دهندگی الکترون (نیروی احیاءکنندگی) مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فعال زیستی است (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007). در بررسی فعالیت احیاءکنندگی عصاره‌های گیاهی گزارش شده است که با افزایش غلظت عصاره، میزان فعالیت احیاءکنندگی عصاره نیز افزایش یافت (Nabavi et al., 2008) که نتایج پژوهش حاضر را تایید می‌نماید.

نتیجه‌گیری نهایی

میزان ترکیبات فنلی کل عصاره‌های تهیه شده از حلال‌های مختلف (استون، اتانول و متانول) از برگ سیاه ولیک (*Crataegus elbursensis* L.) تحت تأثیر نوع و غلظت حلال می‌باشد. نتایج نشان داد که غلظت ۸۰ درصد کلیه حلال‌ها بیشترین میزان ترکیبات فنلی کل برگ ولیک را استخراج نمود و در این بین متانول ۸۰ درصد بیشترین کارایی را داشت. همچنین ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش‌های تعیین فعالیت آنتی-اکسیدانی کل و ظرفیت احیای آهن عصاره متانولی ۸۰ درصد برگ ولیک با افزایش غلظت عصاره افزایش نشان داد. با توجه به نتایج این مطالعه مشخص شد که بهترین حلال برای استخراج ترکیبات فنلی کل برگ سیاه ولیک، متانول ۸۰ می‌باشد. همچنین مقایسه میزان ترکیبات فنلی کل این گیاه با سایر گیاهان به ویژه گونه-های دیگر ولیک نشان می‌دهد که برگ این گیاه حاوی ترکیبات فنلی با ارزش به میزان زیاد است و دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانی خوبی است. بنابراین می‌توان از برگ این گیاه به عنوان منبع استخراج ترکیبات فنلی به منظور تهیه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در صنایع مختلف استفاده نمود.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی شماره ۲/٤۳۹۹۲ با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

References

Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chemistry, 102:1233–1240.

Bernatonienė, J., Masteikova, R., Majienė, D., Savickas, A., Kėvelaitis, E., Bernatonienė, R., Dvorácková, K., Civinskiene, G., Lekas, R., Vitkevicius, K. and Pečiūra, R. (2008). Free radical-scavenging activities of *Crataegus monogyna* extracts. Medicina, 44(9): 706-716.

Froehlicher, T., Hennebelle, T., Martin-Nizard, F., Cleenewerck, P., Hilbert, J.L., Trotin, F. and Grec, S. (2009). Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. Food Chemistry, 115(3): 897-903.

Ghahreman, A. 2007. Flora of Iran. Research institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Hayouni, EA., Abedrabba, M., Bouix, M. and Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. Food Chemistry, 105(3): 1126-1134.

Huda-Faujan, N., Noriham, A., Norrakiah, AS. and Babji, AS. (2009). Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds." African Journal of Biotechnology, 8: 484-489.

Jung, CH., Seog, H.M., Choi, IW., Park, MW. and Cho, HY. (2006). Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. LWT-Food Science and Technology, 39: 266-274.

Kumaran, A. and Karunakaran, R.J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. LWT-Food Science and Technology, 40(2): 344-352.

Mohsen, S.M. and Ammar, A.S. (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. Food Chemistry, 112(3): 595-598.

Nabavi, S.M., Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Hamidinia, A. and Bekhradnia, AR. (2008). Determination of antioxidant activity, phenol and flavonoids content of *Parrotia persica* Mey. Pharmacologyonline, 2: 560-567.

Pham, HNT., Nguyen, VT., Vuong, QV., Bowyer, M.C. and Scarlett, C.J. (2015). Effect of extraction solvents and drying methods on the physicochemical and antioxidant properties of *Helicteres hirsuta* Lour. leaves. Technologies, 3(4): 285-301.

Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry, 269: 337-341.

Rabiei, K., Bekhradnia, S., Nabavi, SM., Nabavi, SF. and Ebrahimzadeh, MA. (2012). Antioxidant activity of polyphenol and ultrasonic extracts from fruits of *Crataegus pentagyna* subsp. elburensis. Natural Product Research, 26(24): 2353-2357.

Rumbaoa, RGO., Cornago, DF. and Geronimo, IM. (2009). Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine potato (*Solanum tuberosum*) tubers. Journal of Food Composition and Analysis, 22: 546-550.

Salmanian, S., Sadeghi Mahoonak, AR., Alami, M. and Ghorbani, M. (2014). Phenolic content, antiradical, antioxidant, and antibacterial properties of hawthorn (*Crataegus elbursensis*) seed and pulp extract. Journal of Agricultural Science and Technology, 16: 343-354.

Shahidi, F. and Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects–A review. Journal of Functional Foods, 18: 820-897.

Shahidi, F. and Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity". Journal of Functional Foods, 18: 757-781.

Shortle, E., O'Grady, MN., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N. and Kerry, JP. (2014). Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. Meat Science, 98(4): 828-834.

Singh, S. and Singh, RP. (2008). In Vitro Methods of Assay of Antioxidants: An Overview." Food Reviews International, 24: 392-415.

Slinkard, K. and Singleton, VL. (1977). Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28: 49-55.

Soares, AA., Souza, CGM., Daniel, FM., Ferrari, GP. , Costa, SMG. and Peralta, RM. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei Murril*) in two stages of maturity. Food Chemistry, 112: 775-781.

Spigno, G., Tramelli, L. and De Faveri, DM. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering, 81(1): 200-208.

Suzuki, M., Watanabe, T., Miura, A., Harashima, E., Nakagawa, Y. and Tsuji, K. (2002). An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, 49: 507-511.

Tajik, S., Zarin Kamar, F. and Niknam, V. (2018). Evaluation of antioxidant activity and total phenolic content of *Crocus sativus* L. organs. The Modares Semiannual Biological Sciences, 8(3): 127-138.

Trabelsi, N., Megdiche, W. , Ksouri, R. , Falleh, H. , Oueslati, S. , Soumaya, B. , Hajlaoui, H. and Abdelly, C. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. LWT-Food Science and Technology, 43(4): 632-639.

Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, YS. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. Food Chemistry, 99(4): 835-841.

Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, AA. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 4083-4089.

Yu, J., Wang, L. , Walzem, RL., Miller, EG., Pike, LM. and Patil, BS. (2005). Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(6): 2009-2014.

Zargari, A. (1997). A Medicinal Plants (Volume 4th). Tehran university publications, Tehran.